

KONINKRIJK DER

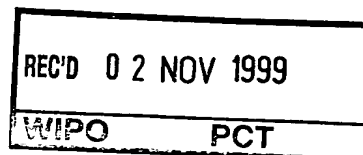


NEDERLANDEN

PCT/NL 99/00518
09/17 27 916

Bureau voor de Industriële Eigendom

E/HV



Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 27 november 1998 onder nummer 1010670,
ten name van:

STICHTING VOOR DE TECHNISCHE WETENSCHAPPEN

te Nieuwegein

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Werkwijze voor het detecteren van een DNA-volgorde, een DNA-volgorde, een werkwijze voor
het maken van DNA-construct en toepassing daarvan",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Rijswijk, 8 september 1999.

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,
voor deze,

A.W. van der Kruk.

UITTREKSEL

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het detecteren van een DNA-volgorde die er ten minste deels toe bijdraagt dat het stabiel tot expressie komen van gen wordt bevorderd. Daartoe wordt een te onderzoeken DNA-fragment in een vector gekloneerd tussen i) een DNA-volgorde die betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine, en ii) een reporter-gen.

De uitvinding heeft tevens betrekking op een met de uitvinding te detecteren DNA-volgorde en het toepassen van een stabiele expressie-bevorderende DNA-volgorde voor het stabiel tot expressie brengen van een gen.

Werkwijze voor het detecteren van een DNA-volgorde, een DNA-volgorde, een werkwijze voor het maken van een DNA-construct en toepassing daarvan

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het detecteren van een DNA-volgorde.

Het is lastig een specifieke DNA-volgorde te detecteren waarvan de nucleotidevolgorde niet bekend is. Ofschoon genetische manipulatie reeds sinds tientallen jaren wordt toegepast, is het voorspelbaar tot expressie brengen van een gen in een genetisch gemanipuleerde plant, dier of ander eukaryoot organisme een probleem. Ofschoon bij veel microbiologische productiewijzen slechts wordt gestreefd naar een zo hoog mogelijke expressie, is voor veel toepassingen bij planten of dieren de precieze mate waarin een gen tot expressie komt van groot belang. Zowel te veel expressie als te weinig expressie kunnen ertoe leiden dat het gewenste resultaat niet wordt bereikt. Ook blijkt in de praktijk dat na geslachtelijke voortplanting het vermogen tot expressie in een latere generatie vaak weer verloren gaat. Verder is het ook moeilijk het tijdstip van expressie en de plaats in het organisme (weefsel-specificiteit) te controleren.

De onderhavige uitvinding beoogt een werkwijze van de in de aanhef genoemde soort te verschaffen welke het mogelijk maakt een DNA-volgorde te isoleren waarmee de bovengenoemde problemen kunnen worden vermeden.

Daartoe wordt de werkwijze volgens de aanhef gekenmerkt doordat de te detecteren DNA-volgorde een stabiele expressie-bevorderende eigenschap heeft, welke werkwijze de stappen omvat van

- 1) het in een vector cloneren van DNA-fragmenten met een grootte <5000 baseparen tussen i) een DNA-volgorde welke betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine, en ii) een reporter-gen dat een promotor omvat, onder oplevering van een verscheidenheid van een fragment bevattende vectoren waarbij de afstand tussen de DNA-volgorde welke betrokken is bij de inductie

van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine en het reporter-gen minder dan 5000 baseparen is;

- 2) het in gastheercellen brengen van de vectoren, in welke gastheercellen de promotor actief kan zijn doch inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine in de vectoren tot onderdrukking van de transcriptie van het reporter-gen leidt; en
- 3) het aan een selectie onderwerpen van de gastheercellen om een gastheercel die activiteit van het reporter-gen vertoont te identificeren.

Aldus wordt een betrouwbare werkwijze verschaft voor het detecteren van DNA-volgorden met een stabiele expressie-bevorderende eigenschap. Als DNA in stap 1 wordt bijvoorbeeld met een restrictie-enzym geknipt DNA van een eukaryoot organisme, in het bijzonder een plant of gewerveld dier, gebruikt, waarbij de DNA-fragmenten een grootte hebben van minder dan 5000 baseparen.

Hierbij zal het duidelijk zijn dat in het voorkomende geval op eenvoudige wijze onderscheid kan worden gemaakt tussen enerzijds een expressie-verhogende volgorde ("enhancer"), die het transcriptie onderdrukkende effect van chromatine in extreme gevallen zou kunnen neutraliseren, en anderzijds het stabiele expressie-bevorderende DNA-fragment. In het eerste geval wordt het reporter-gen in een organisme getransformeerd met een vector die de enhancer tezamen met het reporter-gen bevat maar zonder de transcriptie onderdrukkende volgorde in hogere mate tot expressie gebracht dan in een organisme getransformeerd met een vector die een stabiele expressie-bevorderend DNA-fragment tezamen met het reporter-gen bevat en eveneens zonder de transcriptie onderdrukkende volgorde.

Volgens een eerste voorkeursuitvoering geschiedt het selecteren in stap 3) onder gebruikmaking van een reporter-gen dat resistentie verschaft tegen een groeiremmend agens en worden de gastheercellen gekweekt in aanwezigheid van het groeiremmende agens.

Hierdoor wordt de groei van gastheercellen die zonder een actief resistentie-verlenend gen niet resistent zijn tegen het groeiremmende agens geremd en kunnen die gastheer-

cellen welke een stabiele expressie-bevorderende DNA-volgorde bezitten worden geselecteerd.

Bij voorkeur is het groeiremmende agens aanwezig in een concentratie die zo hoog is dat gastheercellen waarin het
5 gen dat resistentie verschaft tegen het groeiremmende agens niet actief is worden gedood.

Aldus wordt in hoge mate verzekerd dat groeiende organismen een vector bevatten met de gewenste DNA-volgorde.

10 Zeer geschikt wordt als het groeiremmende agens een antibioticum toegepast en is het reporter-gen een resistentie tegen het antibioticum verlenend gen.

Er is een grote verscheidenheid aan resistentie tegen antibioticum verlenende genen in het vak beschikbaar, waardoor eenvoudig een voor de gastheercel geschikt gen kan
15 worden gekozen. Daarbij wordt een gen gekozen dat resistentie verschaft tegen een groeiremmend agens waar de gastheercel niet van nature al resistent tegen is.

Volgens een tweede uitvoeringsvorm codeert het reporter-gen voor *Green Fluorescent Protein*.

20 Dit maakt het mogelijk door fluorescentiemeting gastheercellen met de gewenste DNA-bevattende vector te detecteren en te isoleren.

Volgens een voorkeursuitvoering worden fluorescente gastheercellen van niet-fluorescente gastheercellen gescheiden met behulp van een *Fluorescence-Activated Cell Sorter*
25 (*FACS*).

Volgens een derde uitvoeringsvorm is het reporter-gen luciferase. Met luciferase kan de expressie in een (semi)kwantitatieve wijze worden gemeten.

30 Bij voorkeur hebben in stap 1) de fragmenten in hoofdzaak een grootte tussen 2000 - 3000 base-paren.

Fragmenten van een dergelijke grootte maken het mogelijk de te detecteren volgorde nauwkeuriger te lokaliseren zonder dat het aantal in stap 3) na te lopen gastheercellen
35 zo groot wordt dat dit een onnodige werkbelasting gaat vormen.

De DNA-volgorde die betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine is geschikt een DNA-volgorde die door een heterochromatine-bin-

dend eiwitcomplex dat HP1 (heterochromatine-bindend eiwit 1) omvat wordt herkend en het HP1-omvattende complex in de gastheercel tot expressie wordt gebracht. Volgens een alternatieve werkwijze wordt de DNA-volgorde herkend door een complex dat een Polycombgroep (PcG) eiwit omvat, en wordt het Polycomb groepeiwit-omvattende complex in de gastheercel tot expressie gebracht. Volgens weer een andere uitvoeringsvorm wordt de DNA-volgorde herkend door een complex dat een histon-deacetylase-activiteit bezit, en wordt het histon-deacetylase-activiteit bezittende complex in de gastheercel tot expressie gebracht. Tenslotte is volgens een verdere uitvoeringsvorm de DNA-volgorde die betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine, een DNA-volgorde die door een complex dat een DNA-methyltransferase-activiteit bezit wordt herkend, en wordt het DNA-methyltransferase-activiteit bezittende complex in de gastheercel tot expressie gebracht.

Aldus worden vier geschikte DNA-volgorde herkennende complexen verschaft, waarbij wordt opgemerkt dat in het geval het complex niet in de gastheercel tot expressie komt, dit geen vals positieven oplevert en slechts een beperking betekent van de doelmatigheid waarmee de gezochte DNA-volgorden kunnen worden opgespoord.

Geschikt omvat het eiwitcomplex een fusie-eiwit, zoals een eiwitcomplex waarbij het eerste deel een de DNA-bindingsplaats van Lex A- of GAL4-DNA-bindend deel is.

Dergelijke geschikte DNA-bindingsplaatsen zijn in het vak bekend en zijn afkomstig uit bacteriën respectievelijk gist.

Bij voorkeur is het organisme in stap 1) gekozen uit de groep bestaande uit een plant en een gewerveld dier, zoals in het bijzonder een zoogdier.

Voor deze organismen geldt dat mede door de grote hoeveelheid chromosomaal DNA, zonder de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding, het vinden van de te detecteren DNA-volgorde in wezen niet mogelijk is nu de basevolgorde daarvan immers onbekend is.

Volgens een verdere voorkeursuitvoering is de vector een episomaal replicerende vector, zoals geschikt een vector

die een replicatie-oorsprong van het Epstein-Barr Virus (EBV), OriP, en een nucleair antigeen (EBNA-1) omvat.

Dergelijke vectoren vormen gemakkelijk te hanteren, genetisch te manipuleren en chromatinestructuur waarin de
5 expressie wordt onderdrukt vormende vectoren.

De uitvinding heeft verder betrekking op DNA-volgorde gekozen uit i) een DNA-volgorde geïsoleerd uit een plant of gewerveld dier; of afgeleiden daarvan, en ii) een synthetische of door middel van genetische manipulatie geconstrueerde DNA-volgorde, welke DNA-volgorde met de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding.

Synthetische DNA-volgorden kunnen volgens in het vak algemeen bekende technieken worden bereid. In het bijzonder kunnen grote aantallen verschillende DNA-volgorden worden
15 vervaardigd, en dergelijke volgorden zijn commercieel verkrijgbaar (bijvoorbeeld bij: Pharmacia Biotech, Uppsala, Zweden). Dergelijke synthetische DNA-volgorden moeten wel zijn ingericht voor het kloneren in een plasmide. Dit is in het vak algemeen bekend en geschiedt bijvoorbeeld met een re-
20 strictie knipplaats bevattende *linkers*.

Het zal duidelijk zijn dat de onderhavige uitvinding tevens gericht is op een werkwijze voor het maken van een DNA-construct waarop zich een gen bevindt dat stabiel tot expressie moet worden gebracht, waarbij een stabiele ex-
25 pressie-bevorderende DNA-volgorde op minder dan 2000 bp van het gen wordt ingebracht.

Aldus kan een gen meer stabiel en voorspelbaar tot expressie worden gebracht.

Bij voorkeur wordt de stabiele expressie-bevorderende DNA-volgorde zowel bovenstrooms als benedenstrooms van het gen ingebracht.

Gemeenend wordt dat hierdoor de kans verder wordt vergroot dat het gen stabiel tot expressie kan worden gebracht.

Tenslotte heeft de uitvinding betrekking op een
35 toepassing van het DNA-construct, waarbij het DNA-construct een vector is voor het transformeren van een organisme, waarvoor geschikt een zoals hiervoor gedefinieerd organisme wordt genomen.

CONCLUSIES

1. Werkwijze voor het detecteren van een DNA-volgorde, met het kenmerk, dat de te detecteren DNA-volgorde een stabiele expressie-bevorderende eigenschap heeft, welke werkwijze de stappen omvat van

- 5 1) het in een vector cloneren van DNA-fragmenten met een grootte <5000 baseparen tussen i) een DNA-volgorde welke betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine, en ii) een reporter-gen dat een promotor omvat, onder oplevering van een verscheidenheid
- 10 van een fragment bevattende vectoren waarbij de afstand tussen de DNA-volgorde welke betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine en het reporter-gen minder dan 5000 baseparen is;
- 15 2) het in gastheercellen brengen van de vectoren, in welke gastheercellen de promotor actief kan zijn doch inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine in de vectoren tot onderdrukking van de transcriptie van het reporter-gen leidt; en
- 20 3) het aan een selectie onderwerpen van de gastheercellen om een gastheercel die activiteit van het reporter-gen vertoont te identificeren.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het selecteren in stap 3) geschiedt onder gebruikmaking van een reporter-gen dat resistentie verschaft tegen een

25 groeiremmend agens en de gastheercellen worden gekweekt in aanwezigheid van het groeiremmende agens.

3. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat het groeiremmende agens aanwezig is in een concentratie die zo hoog is dat gastheercellen waarin het gen dat resistentie verschaft tegen het groeiremmende agens niet actief is

30 worden gedood.

4. Werkwijze volgens conclusie 2 of 3, met het kenmerk, dat als het groeiremmende agens een antibioticum wordt toegepast en het reporter-gen een resistentie tegen het anti-

35 bioticum verlenend gen is.

5. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het reporter-gen codeert voor *Green Fluorescent Protein*.

6. Werkwijze volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat fluorescente gastheercellen van niet-fluorescente gastheercellen worden gescheiden met behulp van een *Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS)*.

7. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het reporter-gen luciferase is.

8. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat in stap 1) de fragmenten in hoofdzaak een grootte hebben tussen 2000-3000 baseparen.

9. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat de DNA-volgorde die betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine, een DNA-volgorde is die door een heterochromatine-bindend eiwit complex dat HP1 omvat wordt herkend en het HP1-omvattende complex in de gastheercel tot expressie wordt gebracht.

10. Werkwijze volgens één van de conclusies 1 tot 8, met het kenmerk, dat de DNA-volgorde die betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine, een DNA-volgorde is die door een complex dat een Polycombgroep (PcG) eiwit omvat wordt herkend, en het Polycomb groepeiwit-omvattende complex in de gastheercel tot expressie wordt gebracht.

11. Werkwijze volgens één van de conclusies 1 tot 8, met het kenmerk, dat de DNA-volgorde die betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine, een DNA-volgorde is die door een complex dat een histon-deacetylase-activiteit bezit wordt herkend, en het histon-deacetylase-activiteit bezittende complex in de gastheercel tot expressie wordt gebracht.

12. Werkwijze volgens één van de conclusies 1 tot 8, met het kenmerk, dat de DNA-volgorde die betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine, een DNA-volgorde is die door een complex dat een DNA-methyltransferase-activiteit bezit wordt herkend, en het DNA-methyltransferase-activiteit bezittende complex in de gastheercel tot expressie wordt gebracht.

13. Werkwijze volgens één van de conclusies 1 tot 12, met het kenmerk, dat de DNA-volgorde die betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine, een DNA-volgorde is die selectief door ten minste één DNA-bindend eiwit wordt herkend en het organisme tevens een eiwitcomplex tot expressie brengt dat i) een de DNA-volgorde selectief-bindend eerste deel; en ii) een de vorming van chromatine waarin de transcriptie wordt onderdrukt inducerend tweede deel omvat.
14. Werkwijze volgens conclusie 13, met het kenmerk, dat het eiwitcomplex een fusie-eiwit omvat.
15. Werkwijze volgens conclusie 14, met het kenmerk, dat het eerste deel een de DNA-bindingsplaats van LexA- of GAL4-DNA-bindend deel is.
16. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het organisme in stap 1) is gekozen uit de groep bestaande uit een plant en een gewerveld dier.
17. Werkwijze volgens conclusie 16, met het kenmerk, dat het gewervelde dier een zoogdier is.
18. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat de vector een episomaal replicerende vector is.
19. Werkwijze volgens conclusie 18, met het kenmerk, dat de vector een replicatie oorsprong van het Epstein-Barr Virus (EBV), OriP, en een nucleair antigeen (EBNA-1) omvat.
20. DNA-volgorde gekozen uit i) een DNA-volgorde geïsoleerd uit een plant of gewerveld dier; of afgeleiden daarvan, en ii) een synthetische of door middel van genetische manipulatie geconstrueerde DNA-volgorde, welke DNA-volgorde met de werkwijze volgens één van de conclusies 1 - 18 kan worden gedetecteerd.
21. Werkwijze voor het maken van een DNA-construct waarop zich een gen bevindt dat stabiel tot expressie moet worden gebracht, waarbij een stabiele expressie-bevorderende DNA-volgorde op minder dan 2000 bp van het gen wordt ingebracht.
22. Werkwijze volgens conclusie 21, met het kenmerk, dat de stabiele expressie-bevorderende DNA-volgorde zowel bovenstrooms als benedenstrooms van het gen wordt ingebracht.

23. Toepassing van het DNA-construct verkregen volgens conclusie 22 of 22, waarbij het DNA-construct een vector is voor het transformeren van een organisme.

